



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان  
دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

جداسازی فراکسیونهای ضدالتهاب عصاره متانولی دانه شنبلیله  
(*Trigonella foenum-graecum L.*) با روش HPLC و مقایسه اثر  
مهارکنندگی و بیان ژن INOS و COX-2 در سلولهای ماکروفاژ موشی  
J774A.1 با استفاده از Real-time PCR

توسط:

انسیه کلانتری مقدم

اساتید راهنما:

دکتر فریبا شریفی فر

دکتر مصطفی پورنامداری

دکتر علی ماندگاری

دکتر مهرناز مهربانی

شماره پایان نامه: ۱۰۶۴

زمستان ۱۳۹۷



**Kerman University of Medical Science  
Faculty of Pharmacy**

**Pharm. D. Thesis**

**Title:**

**Separation of anti-inflammatory fractions of methanolic extract of  
fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.) by HPLC and inhibitory  
evaluation and gene expression of INOS and COX-2 in mice macrophage  
cell line J774A.1 using real-time PCR**

**By :**

**Ensiyeh Kalantari Moghaddam**

**Supervisors:**

**Dr. Fariba Sharififar  
Dr. Mostafa Pornamdari  
Dr. Ali Mandegari  
Dr. Mehrnaz Mehrabani**

**Winter 2019**

**Thesis No: 1064**

## چکیده

**مقدمه:** مطالعات اخیر نشان داده است که فراکسیون کلروفرم اسیدی حاصل از استخراج مایع-مایع و بدنبال آن کروماتوگرافی ستونی از عصاره متانولی دانه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) از خانواده Fabaceae دارای اثر ضد التهاب قابل مقایسه با داروهای سنتزی می باشند. در این مطالعه سعی شده است تا یک متد کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) آنالیتیکال جهت جداسازی فراکسیونهای گیاه شنبلیله توسعه داده شود. در ادامه با روش HPLC نیمه تهیه ای، فراکسیونهای عمده گیاه جداسازی شده و اثر ضد التهابی عصاره ی تام دانه شنبلیله و فراکسیون های جدا شده از آن بر روی سلول های ماکروفاژ موشی J774A.1 مورد مقایسه قرار گیرد.

**روش کار:** عصاره متانولی دانه خشک شده گیاه با روش ماسراسیون گرم تهیه شد. یک روش HPLC فاز معکوس آنالیتیکال با استفاده از ستون C18 و فاز متحرک آب و متانول با روش شویش مخلوطی از ایزوکراتیک و گرادیان در دمای اتاق برای آنالیز عصاره خام توسعه داده شد. در ادامه با انجام محاسبات scale-up و توسعه روش HPLC فاز معکوس نیمه تهیه ای، جداسازی فراکسیون های عمده گیاه طی یک سری آنالیزهای ۲۰۰ دقیقه ای انجام گردید. در مجموع ۳۰ فراکسیون (F1-F30) جمع آوری و در دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلا خشک گردیدند. از مجموع فراکسیونها تعداد ۹ عدد در محدوده زمانی ۱۲/۵-۱۸، ۲۹-۳۸/۵، ۵۴/۵-۵۷/۵، ۷۳/۵-۷۶/۵، ۸۵-۸۱، ۱۰۷-۱۰۳، ۱۲۴-۱۲۰، ۱۴۶-۱۴۱ و ۱۶۸-۱۵۸ دقیقه وارد مطالعات سلولی گردید. سپس عصاره تام شنبلیله و ۹ فراکسیون فوق بر روی رده سلول موشی J774A.1 با روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-) (2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) از نظر سیتوتوکسیسیتی مورد ارزیابی قرار گرفتند و غلظت غیر سمی فراکسیونها و عصاره تام دانه شنبلیله بر حسب حداقل ۹۰٪ زنده مانی بعد از ۲۴ ساعت

تعیین گردید. و در ادامه اثر باز دارندگی آن‌ها بر افزایش بیان ژن COX-2 و iNOS ناشی از لیپوپلی ساکارید با استفاده از Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** میزان درصد عصاره تام به دست آمده دانه شنبلیله ۴۷٪ وزنی می باشد. در بررسی اثرات عصاره و ۹ فراکسیون آن بر افزایش بیان COX-2 و iNOS، عصاره تام دانه شنبلیله در غلظت ۱۲۵ µg/ml بیان ژن iNOS را نسبت به گروه درمان با LPS کاهش داد ( $p < 0.001$ ) ولی اختلاف معنی دار در بیان ژن COX-2 در مقایسه با گروه درمان با LPS مشاهده نشد. در میان فراکسیون‌های دانه شنبلیله، F6 (۲۹-۳۸/۵ min) با غلظت ۲۵۰ µg/ml ( $P < 0.05$ )، F9 (۵۴/۵-۵۷/۵ min) با غلظت ۱۲۵ µg/ml ( $P < 0.001$ )، F15 (۸۵-۸۱ min) با غلظت ۲۵۰ µg/ml ( $P < 0.001$ )، F18 (۱۰۳ min) با غلظت ۱۰۷ µg/ml ( $P < 0.001$ ) و F27 (۱۵۸-۱۴۹ min) با غلظت ۶۲ µg/ml ( $P < 0.01$ ) به صورت معنی دار بعد از ۲۴ ساعت بیان iNOS را نسبت به گروه درمان با LPS کاهش دادند ولی اختلاف معنی دار در کاهش بیان ژن COX-2 با گروه درمان مشاهده نشد. از بین فراکسیون‌های به دست آمده، تنها F18 (۱۰۷-۱۰۳ min) با غلظت ۳ µg/ml، بیان ژن COX-2 را نسبت به گروه درمان با LPS بطور معنی داری کاهش داد ( $P < 0.05$ ). در مقابل، F21 (۱۲۰-۱۱۵ min) با غلظت ۶۲ µg/ml پس از ۲۴ ساعت قادر به افزایش معنا دار ( $p < 0.001$ ) بیان ژن COX-2 نسبت به گروه درمان با LPS بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده، فراکسیون شماره ۱۸ دانه شنبلیله، در غلظت غیر سمی، قادر به کاهش بیان هر دو ژن COX-2 و iNOS بوده است و کاندید مناسبی برای پژوهش‌های تکمیلی خواهد بود.

**کلمات کلیدی:** دانه شنبلیله، HLPC، J774A.1، ضد التهاب، iNOS، ماکروفاژ، COX-2.

## Abstract

**Introduction:** Recent studies have shown that several fractions separated from methanolic extract of fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L.) from Fabaceae family have anti-inflammatory effect comparable to synthetic drugs. In this study, It is tried to set up an analytical method of high performance liquid chromatography (HPLC) method to separate these Fenugreek fractions. In the next step, separate these fractions through semi-preparative HPLC and to study the anti-inflammatory effect of separate analytes in comparison to total extract of fenugreek seeds on J774A.1 muse macrophage cells. Active anti-inflammatory analytes can be further purified in future studies.

**Method:** Methanolic extracts of dried seeds were prepared by warm maceration method. In the first stage, an analytical HPLC method of reverse phase with C18 column was developed for separating the major fractions of the plant. 30 (F1-F30) analytes of the plant were collected by scale-uping the selected method on the semi-preparative column. A number of 9 analytes were collected (in time interval of 12- 18.5..... min ) and were examined along with total extract for cytotoxicity evaluation using MTT [(3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] test on J774A.1 cells. Non-toxic concentrations of analytes and total extract were determined and studied for their inhibitory effect against lipo polysaccharide-induced COX-2 and iNOS gene expression by Real-Time PCR.

**Results:** The yield of extraction is 47% w / w. A number of 9 separated analytes were used for cellular studies. In cellular test, total extract at 125 µg / ml significantly decreased iNOS gene expression compared to the LPS group ( $P < 0.001$ ), but did not show a significant effect on COX-2 gene expression comparison to the LPS group .Among the separated analytes, analyte N0.6 (29-38.5 min) at 250 µg/ml and No. 9 (54.5-5.54 min) at 125 µg / ml and analyte No.15 (81-85 min) at 250 µg / ml and No.18 (103-107 min) at 3 µg/ml and No.27 (149-158 min) at 62 µg/ml , significantly decreased after 24 hours of iNOS expression after 24h compared with LPS group with ( $P < 0.05$ ) and ( $P < 0.001$ ) and( $P < 0.001$ ) and ( $P < 0.001$ ) and (  $P < 0.01$  ) respectively without significant effect on COX-2 gene expression. Just analyte No. 18 (103-103) at 3 µg / ml reduced the expression of COX-2 gene compared to the LPS group, this difference was significant ( $P < 0.05$ ). After 24 hours, the analyte number 21 (115-120) at 62 µg / ml, ( $p < 0.001$ ) significantly increased the expression of COX-2 compared to the LPS treatment group.

**Conclusion:** According to the results, analyte No. 18 of Fenugreek seed, in non-toxic concentration, was able to reduce the expression of both COX-2 and iNOS gene, and is an appropriate candidate for the continuation of the work. Finally, it is suggested to do further analysis and isolate this analyte in continuing and evaluate that using in vivo experiments for more accurate conclusions.

**Key words:** fenugreek seed , HPLC , J774A.1 ,anti inflammation , iNOS , Macrophage, COX-2.



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم انسیه کلانتری مقدم دانشجوی شهریه پرداز داروسازی ورودی ۹۱ به شماره: ۱۰۶۴

تحت عنوان:

"جداسازی فراکسیونهای ضد التهاب عصاره متانولی دانه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) با

روش HPLC و مقایسه اثر مهارکنندگی و میان ژن COX-2 و I NOS در سلولهای ماکروفاژ موسی J774.۱ با استفاده از

Real-time pcr

اساتید راهنما:

۱- دکتر فریبا شریفی فر

۲- دکتر مصطفی پورنامداری

۳- دکتر علی ماندگاری

۴- دکتر مهرناز مهربانی

هیئت محترم داوران به ترتیب حروف الفبا:

۱- دکتر حمیدرضا رحیمی

۲- دکتر احسان فقیه میرزایی

۳- دکتر سمیه کرمی مهاجری

۴- دکتر میترا مهربانی

در تاریخ ۹۷/۱۱/۲۸ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۹ .....  
(با حروف) نوزده تمام ..... به تصویب رسید.

دکتر یعقوب پور شجاعی  
رئیس اداره پایان نامه

دکتر محمود رضا حیدری  
رئیس دانشکده

